

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 616.831.9-002-022-579.861.1]-07:575

Е. Н. Родионова, А. Е. Платонов, Ю. Я. Венгерова, Е. В. Kaczmarzki, M. Guiver, R. Borrow, О. Ю. Шипулина, Г. А. Шипулин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК NEISSERIA MENINGITIDIS МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ И ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ МЕНИНГОКОККОВОГО МЕНИНГИТА

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; ГОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет Минздрава России, Москва; Референтная менингококковая лаборатория (Manchester Public Health Laboratory), Великобритания

Гнойный бактериальный менингит является одной из наиболее тяжелых инфекционных болезней. Для оценки тяжести течения менингита предложены различные клинические и лабораторные критерии (концентрация менингококкового липополисахарида, активность комплемента в крови, активность ферментов в лейкоцитах ликвора) [2, 3]. Норвежскими исследователями выявлена четкая связь количества менингококковой ДНК в плазме и спинно-мозговой жидкости (СМЖ) у больных генерализованной формой менингококковой инфекции (ГФМИ) с уровнем менингококкового липополисахарида, играющего значительную роль в развитии эндотоксического шока и полиорганной недостаточности [7]. В связи с этим значительный интерес представляет изучение связи клинико-лабораторных показателей и бактериальной нагрузки *N. meningitidis* в СМЖ при менингококковом менингите, одним из подходов к определению которой является использование технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) в формате реального времени [4–7].

Целью работы являлось определение методом ПЦР концентрации ДНК менингококков в СМЖ у больных менингококковым менингитом, а также выявление взаимосвязи бактериальной нагрузки и клинических проявлений менингита.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе референтной менингококковой лаборатории МРНЛ (Великобритания) по методике, разработанной M. Guiver и соавт. [4]. Авторами для оценки специфичности были использованы 253 образца ДНК штаммов вирусов и бактерий, способных вызвать воспалительные процессы на оболочках головного мозга, а также 46 образцов геномной ДНК человека. При проведении ПЦР аналитическая специфичность составила 100%.

Клинические образцы. Исследовали 41 образец СМЖ, взятой путем спинно-мозговой пункции при поступлении больных ГФМИ в стационар. Возраст больных составлял от 4 мес до 69 лет; детей было 20 (49%), взрослых — 21 (51%); лиц мужского пола — 22 (54%), женского — 19 (46%). Больные поступали на 1–7-й день болезни. Заболевание протекало в среднетяжелой форме у 15 (37%) больных, в тяжелой — у 24 (59%), в очень тяжелой — у

2 (5%); 2 (5%) больных умерли на 1-й день госпитализации. У больных имели место следующие осложнения: инфекционно-токсический шок (ИТШ) III степени — у 5 (5%), отек-набухание головного мозга (ОНГМ) — у 15 (37%), инфекционно-аллергический артрит — у 3 (7%), инфекционно-токсическая кардиомиопатия — у 2 (5%). В 1 случае заболевание протекало с клинической картиной менингоэнцефалита.

Выделение ДНК. К 100 мкл СМЖ добавляли 1 мл DNazol ("Life Technologies", Шотландия), тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 мин при 20°C. Добавляли 500 мкл 100% этанола, перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 10 мин при 20°C. Затем центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Удаляли супернатант, добавляли 1 мл 75% этанола, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин. Супернатант полностью отбирали, осадок ресуспендировали в 50 мкл деионизированной воды, пробирки помещали в термостат с температурой 50°C на 10 мин.

Праймеры и проведение ПЦР. Мишенью для выбора праймеров явился ген *ctrA*, специфичный для менингококков [4–6]. Последовательность оснований в праймерах была следующая (позиция нуклеотидов в геноме соответствует номеру M80593 согласно GenBank): GCT GCG GTA GGT GGT TCA A (617-635), TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA (727-708), зонд 6-FAM-CAT TGC CAC GTG TCA GCT GCA CAT-TAMRA-phospha (680-657). Количественное определение копий ДНК менингококков выполняли на приборе 7700 Sequence Detection System ("Applied", США). Амплификацию ДНК проводили с помощью коммерческого набора "TaqMan Universal Master Mix kit" ("Applied") в 25 мкл раствора, содержащего праймеры в концентрации 300 нМ каждый и ДНК-зонд в концентрации 25 нМ; смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дУТФ) каждый в концентрации 200 мкМ; 5,5 мМ MgCl₂ и 1,25 ЕТaq-полимеразы. В каждую пробу вносили 2 мкл ДНК-матрицы. Подобранные в процессе работы оптимальные параметры ПЦР были следующими: прогревание в течение 2 мин при 50°C для активации работы урицилгликозилазы; денатурация пробы в течение 10 мин при температуре 95°C; затем 45 циклов со сменой температурного профиля (95°C — 15 с и

60°C — 1 мин). В качестве положительного контроля для построения калибровочной кривой использовали ряд 10-кратных разведений ДНК *N. meningitidis* в концентрации 10^9 — 10^4 копий/мл. Отсутствие увеличения флуоресценции после 45-го цикла расценивали как отрицательный результат.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью коммерческих пакетов программ SPSS 9.0, ACCESS 7.0. Коэффициент корреляции вычисляли по Спирмену, для проверки значимости различий в группах использовали непараметрический критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Число копий менингококковой ДНК в образцах СМЖ варьировало от $5,5 \cdot 10^4$ до $7,3 \cdot 10^9$ /мл (медиана $1,2 \cdot 10^7$ /мл), что в пересчете на логарифмические единицы (1 лог. ед. = \log_{10} (число копий в 1 мл) составило от 4,8 до 9,9 лог.ед/мл (в среднем $7,1 \pm 1,5$ лог.ед/мл).

При изучении взаимосвязи количества копий с рядом клинико-лабораторных показателей была выявлена статистически значимая корреляция числа копий с исходом — у 2 умерших имели место самые высокие показатели ($p < 0,01$); тяжестью течения болезни ($p < 0,05$) и наличием осложнений ($p < 0,05$); нарушением сознания ($p < 0,001$), длительностью анизорефлексии ($r = 0,99$, $p < 0,001$) и менингеального синдрома ($r = 0,44$, $p < 0,01$). Связь количества копий с другими клиническими проявлениями, а также с приемом антибиотиков на догоспитальном этапе и серогруппой менингококка, вызвавшего заболевание, не выявлена. У больных, поступивших в 1-й день болезни, количество копий в СМЖ было большим, чем у поступивших в более поздние сроки ($p < 0,05$).

При исследовании показателей СМЖ выявлена корреляция количества копий с высоким уровнем белка ($r = 0,43$, $p < 0,01$) и нейтрофильным плеоцитозом ($r = 0,46$, $p < 0,01$), что отражает воспалительный процесс на оболочках головного мозга.

Отмечена отрицательная корреляция между количеством копий менингококковой ДНК в СМЖ и таким проявлением интоксикационного синдрома, как высокая температура ($r = -0,32$, $p < 0,05$), что связано с наличием в этой группе наиболее тяжелых больных — с ИТШ и ОНГМ с дислокацией, которым нередко свойственна гипотермия.

У 28 (68%) больных полисахаридный менингококковый антиген в СМЖ был выявлен методом

латекс-агглютинации; в этих образцах СМЖ число копий было большим ($p < 0,001$). Культура менингококка была высеяна из СМЖ у 20 (49%) больных, при этом связь с количеством копий не обнаружена.

По данным современных исследований, бактериальные менингиты в Москве в 65% случаев вызываются менингококками [1], при этом отмечается невысокий процент этиологического подтверждения бактериологическими (30—50) и иммунологическими (50—80) методами. Нами установлено, что использование ПЦР в реальном времени с праймерами к консервативному участку гена белка наружной мембраны менингококков *ctrA* для детекции возбудителя в СМЖ больных менингококковым менингитом является высокоспецифичной и чувствительной методикой. Данный подход позволил выявить возбудителя в большем проценте случаев, чем культуральным методом и с помощью реакции латекс-агглютинации. Следует особо отметить быстроту исследования, минимальный риск контаминации продуктами ПЦР и как следствие уменьшение числа ложноположительных результатов при проведении ПЦР в реальном времени.

Нами выявлено, что количественная оценка содержания копий ДНК менингококков в СМЖ коррелирует с тяжестью течения менингита и может служить прогностическим фактором. Несмотря на то что определение бактериальной нагрузки в СМЖ не может быть широко использовано в клинической практике, полученные результаты дополняют понимание патогенеза гнойных менингитов и могут быть использованы для прогноза течения и исхода заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королева И. С. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за гнойными бактериальными менингитами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2000.
2. Платонов А. Е., Троцанский Д. Б., Белобородов В. Б. и др. // Клини. мед. — 1999. — № 2. — С. 32—37.
3. Филатова Т. Г. Функциональное состояние клеток крови и цереброспинальной жидкости при бактериальных и вирусных менингитах: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1992.
4. Corless C. E., Guiver M., Borrow R. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 4. — P. 1553—1558.
5. Guiver M., Borrow R., March J. et al. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2000. — Vol. 28, N 2. — P. 173—179.
6. Hackett S. J., Carrol E. D., Guiver M. et al. // Arch. Dis. Child. — 2002. — Vol. 86, N 6. — P. 449—452.
7. Ovstebo R., Brusletto B., Haug K. B. F. et al. // Abstracts of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference. — Oslo, 2002. — P. 230.

Поступила 06.06.07